Lane Medical Library

Aus der Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleissheim.

Beiträge zur Feststellung der Bang-Infektion beim Meerschweinchen mit der Frischblutschnellagglutination.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ludwig Sandner
appr. Tierarzt aus Osterhofen/Nby.

1934

Druck der Salesianischen Offizin München O 11

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Referent: Prof. Dr. W. Ernst.

Gewidmet meinen lieben Eltern
aus Dankbarkeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0065

A. Schrifttum.

Zur Ermittlung einer Infektion wird bei einer Reihe von Krankheitserregern neben anderen Verfahren das der Agglutination beigezogen. Es besteht darin, dass aus entnommenem Blut das Serum gewonnen wird und dieses dann in verschiedenen Verdünnungen mit einer Aufschwemmung von Erregern der vermuteten Krankheit (Testflüssigkeit) im Reagenzglas zusammengebracht wird. Hat das Serum die Fähigkeit, diese Erreger spezifisch zu agglutinieren, so ist der Rückschluss, dass bei dem Individuum, von dem das Blut stammt, eine Infektion mit den betreffenden Erregern stattgefunden hat, zulässig. Wegen seiner verhältnismässig hohen Zuverlässigkeit bei einer Reihe von Krankheiten wird das Verfahren im allgemeinen sehr geschätzt. Gewisse Nachteile liegen aber darin, dass zu seiner Durchführung die Einrichtungen einer Untersuchungsstelle zu Hilfe genommen werden müssen und es infolgedessen zeitraubend ist und auch nicht ganz billig kommt; dass zu seiner Durchführung und Ergebnisbeurteilung gewisse Erfahrungen nötig sind, und dass die Entnahme nicht zu geringer Blutmengen Voraussetzung ist. Zur Ermittlung fortlaufender Ergebnisse vor allem sind wiederholte Blutentnahmen bedingt. Bei Grosstieren sind diese in der Regel ohne weiteres durchführbar, nicht aber ebenso bei Kleintieren, sei es, dass schon der wiederholte Blutentzug für diese Tiere unzuträglich ist, sei es, dass die Gewinnung des Blutes selbst (Absaugen am Ohr, Herzpunktion u.a.) bei Wiederholungen mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Diese Umstände gaben Veranlassung, nach Verfahren zu suchen, die in einfacher, rascher und sicherer Weise und unter Benützung kleinster Blutmengen eine beliebig häufige Vornahme der Blutuntersuchung auch an kleinen Versuchstieren gestatten. So wurden schliesslich rasch arbeitende Untersuchungmethoden ausgearbeitet, die unter dem Namen Schnellagglutinationen zusammengefasst werden. Je nachdem zur Anstellung der Schnellagglutination Frischblut oder Blutserum oder Trockenblut verwendet wird, spricht man von Frischblutschnellagglutination, Serumschnellagglutination und Trockenblutschnellagglutination.

I. Frischblutschnellagglutination.

Zur Vornahme der Frischblutschnellagglutination wurden anfänglich lediglich je ein Tropfen Frischblut und Testflüssigkeit auf einen Objektträger verbracht und innig miteinander vermischt. Diese einfachste Methode hat erstmals Bass und Watkins im Jahre 1910 zur Diagnose des Typhus abdominalis beigezogen. Später (1928) hat Bevan das Verfahren dahin geändert, dass er Blut und Test in einem Glasröhrchen zur Mischung brachte. Da bei eingetretener Agglutination die milchig getrübte Test aufklarte, benützte Bevan diese Aufhellung zur Ablesung seiner Reaktion. Ein in dem Glasröhrchen angebrachter Papierstreifen mit dem Aufdruck „infected" wurde bei vollzogener Agglutination sichtbar. Diese Methode fand jedoch wenig Anhänger. In neuester Zeit hat Kutzner die Frischblutschnellagglutinationsmethode nach Bass und Watkins in der Weise geändert, dass er zur Verhinderung der Gerinnung Oxalat- bzw. Zitratlösung dem Frischblut zusetzte und die Reaktion auf einem Objektträger ausführte. In der Benützung gefärbter Testflüssigkeit sah Kutzner keine Vorteile. Eine Verbesserung der Methode nach Kutzner brachte Diernhofer, der die Gerinnung des Blutserums durch Zusatz von Kalium-Natrium- oder Ammoniumoxalatlösung verhinderte und die roten Blutkörperchen durch Verwendung von doppelt destilliertem Wasser bei Herstellung der Testflüssigkeit auflöste. Im Gegensatz zu Kutzner betonte Diernhofer die Zweckmässigkeit der Verwendung einer gefärbten Testflüssigkeit.

Die Frischblutschnellagglutination wird in der Folge mit „F.S.A.", die Serumlangsamagglutination mit „S.L.A." bezeichnet.

a. Die Methode nach Bass und Watkins.

Die guten Erfolge mit der F.S.A. nach Bass und Watkins (2) haben Buneya, Hall und Dorset (6) veranlasst, die Methode zum Nachweis der Pulloruminfektion des Huhnes zu verwenden. Sie vermischten einen frisch entnommenen Bluttropfen und die Testflüssigkeit auf einem Objektträger mit einem feinen Glasstab und legten besonderen Wert darauf, dass eine Test aus gut agglutinierenden Stämmen und in starken Konzentrationen angewandt

wurde. Als Bakterienabschwemmungsflüssigkeit diente physiologische Kochsalzlösung. Wagener (34) zog vor, den frisch entnommenen Bluttropfen mit Hilfe eines geschliffenen Objektträgers (Ausstreicher) auf einen zweiten Objektträger gleichmässig zu verteilen. Ein Tropfen Test wurde unmittelbar auf den noch feuchten Blutausstrich verbracht und konnte dort selbst gleichmässig zerfliessen. Zur Herstellung der Test benützte Wagener (34) bis 48 stündige Pullorumkulturen, welche entweder mit 4% iger Kochsalzlösung oder mit Formalin (0,85% Kochsalz und 0,1% Formalin) abgeschwemmt wurden. Mit beiden Abschwemmungsflüssigkeiten sollen gleich gute Ergebnisse erzielt worden sein. Zur Erleichterung der Ablesung diente eine Glasbank mit schwarzer Papierunterlage. Die Ergebnisse der F.S.A. deckten sich mit denen der S.L.A. und mit den Sektionsbefunden in allen Fällen so einwandfrei, dass die Reaktion als brauchbar empfohlen wurde. Später riet Wagener (35), je einen Tropfen Blut und Test auf den Objektträger zu verbringen, beide mit Hilfe des Ausstreichers unverzüglich zu vermischen und zwei Minuten lang zu beobachten. Diese Art der Technik entsprach in allem der erstmals von Bass und Watkins angegebenen Methode. Miessner und Berge (21) wandten die F.S.A. in gleicher Versuchsanordnung ebenfalls zum Nachweis der Pulloruminfektion des Huhnes an. Sie empfahlen zur Verhinderung rascher Gerinnung Blut und Test in Tropfenform auf einer allenfalls erwärmten Glasplatte bei einer Temperatur von unter 20° Celsius mit Hilfe eines Glasstabes zu mischen. Die Ergebnisse der F.S.A. waren gleichwertig denen der S.L.A. Steenblock (32) zog gleichfalls die Methode nach Bass und Watkins bei. Er hielt es für notwendig, zuerst den Bluttropfen mit Hilfe eines geschliffenen Objektträgers auszubreiten und auf diesen feuchten Ausstrich die Test in Tropfenform zu verbringen. Eine Vermischung von Blut und Test mit einem Glasstab erschien ihm ungeeignet. Steenblock verwandte zu seinen Versuchen einen eigens für diesen Zweck von ihm konstruierten Agglutinationstisch, dessen Glasplatte mit einem darunter angebrachten Spiegel beleuchtet werden konnte. Eine Erwärmung erschien unnötig; die Beobachtungszeit betrug 6 — 10 Minuten. Steenblock kam zu

dem Ergebnis, dass die F.S.A. zur Ermittlung pulloruminfizierter Hühner grosse technische Vorteile biete und dabei doch gleiche Untersuchungsergebnisse zeitige, wie die S.L.A. – Miessner hat zusammen mit Schütt (22 u. 23) in Fortführung früherer Untersuchungen besonders darauf aufmerksam gemacht, dass bei Anwendung der Methode nach Bass und Watkins der Blut- und Testtropfen gleich gross zu sein haben, dass die benützten Objektträger fettfrei und trocken sein müssen, und dass die Reaktionen am besten bei 10 bis 20° Celsius auszuführen sind. Für eine etwaige Konservierung der Testflüssigkeit rieten die Verfasser, Formalin (0,1%) oder Yatren (1,0%) oder Chinosol (0,5%) zu verwenden. Eine Verbesserung der Technik erzielten sie durch 3%igen Zusatz einer 1%igen Kristallviolettlösung zur Testflüssigkeit. Zur Beobachtung der Reaktion genügte eine Minute. Fleischhauer (13) arbeitete ebenso und bediente sich dabei des Agglutinationstisches nach Steenblock. Nach Fleischhauer sollte die Beobachtungszeit mindestens vier Minuten, besser jedoch fünf bis zehn Minuten dauern. Er konnte feststellen, dass die F.S.A. weder eine wesentliche Beschleunigung des Untersuchungsganges noch sonst irgendwelche Vorteile bedeutet. Diesem abfälligen Urteil Fleischhauers gegenüber betonte Peters (27), dass die F.S.A. zwar 3 bis 5% Fehlergebnisse bringt, dass diese aber im Hinblick auf die grosse Zeitersparnis und Einfachheit der Handhabung mit in Kauf genommen werden können. Zu gleich guten Ergebnissen war auch Schmid (29) gekommen. Er fand, dass die F.S.A. zur Auffindung chronisch infizierter Hennen ebenso brauchbar war wie die S.L.A., dabei aber noch empfindlicher. Er hielt es jedoch für notwendig, beim Vorkommen fraglicher Reaktionen die S.L.A. beizuziehen. Bianchini (5) hat die F.S.A. zum Nachweis der Pulloruminfektion vergleichsweise mit anderen Schnellmethoden durchgeführt und gefunden, dass sich die F.S.A. nach Bass und Watkins am besten bewährt hat. Er hielt eine Beobachtungsdauer von vier und mehr Minuten für unerlässlich. Zur Ermittlung der Banginfektion beim Meerschweinchen benützte Ali Ekrem (12) die F.S.A. unter Verwendung von Frischblut und einer Test aus 48 stündigen Abortuskulturen in physiologischer Kochsalzlö-

sung. Die Dichte der Test betrug 1 ccm physiologische Kochsalzlösung pro Agarkultur. Das Antigen wurde stets frisch verwandt und vor Gebrauch durch Watte filtriert. Die Reaktion wurde auf dem Objektträger angesetzt und während zwei Minuten bei Zimmertemperatur beobachtet. Ali Ekrem verglich die Ergebnisse seiner Schnellagglutinationsversuche mit den Resultaten der S.L.A., hielt die Methode aber nur bei positivem Ergebnis für verwertbar, weil sie bei einem Serumtiter von 1:10 bis 1:300 vollkommen versagte und selbst bei Titerhöhen bis 1:800 noch lückenhafte Ergebnisse aufwies. In neuester Zeit hat David (8) die F.S.A. nach Bass und Watkins in abgeänderter Form zum Nachweis der Banginfektion des Rindes beigezogen. Verfasser änderte die ursprüngliche Methode insofern, als er als Test abgetötete und gefärbte Abortusbazillen benützte. Die Test wurde mit Karbolkochsalzlösung hergestellt, während 30 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und nach der Filtration durch Gaze mit 3% einer 1%igen alkoholischen Kristallviolettlösung gefärbt. Frisch zubereitete Test war weniger empfindlich und soll deshalb vor Gebrauch einige Tage im Eisschrank bei 6—8° Celsius gehalten werden. David hielt starke Agglutinationen, die innerhalb fünf Minuten auftraten, für positiv, schwache Agglutinationen während derselben Zeit dagegen für fraglich. Die guten Ergebnisse seiner Versuche veranlassten ihn, die Schnellagglutination für praktische Verhältnisse zum Nachweis der Banginfektion zu empfehlen.

b. Methode nach Bevan.

Bevan (3) hat eine besondere Apparatur zur Schnelldiagnose der Banginfektion ausgearbeitet. Diese bestand aus einem Glasröhrchen, das mit etwa 10 ccm Abortusbazillenaufschwemmung gefüllt wurde. Der Stopfen des Röhrchens trug eine Drahtöse von 0,1 ccm Fassungsvermögen, die zur Aufnahme eines Bluttropfens des zu untersuchenden Tieres diente. Im Röhrchen befand sich ein Papierstreifen, dem das Wort „infected“ aufgedruckt war. Bei positiver Reaktion trat Ausflockung und somit Klärung der Flüssigkeit ein, wodurch das Wort „infected“ lesbar wurde. Bei negativer Reaktion blieb die Bakterienaufschwemmung gleichmässig trüb und das Wort

„infected" war unleserlich. Graham, Robert und Frank Thorp jr. (14) verglichen die Methode nach Bevan mit der später beschriebenen Huddleson-Methode und fanden sie brauchbar.

c. Methode nach Kutzner.

Kutzner (19) stellte 1932 an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleissheim Versuche an, um die F.S.A. in ihrer Abhängigkeit von bestimmten äusseren Faktoren zu prüfen. Grundsätzlich bediente er sich der Methode nach Bass und Watkins. Er vermischte nämlich einen Tropfen Blut mit einem Tropfen Test auf einem Objektträger und strich das Gemisch in Markstückgrösse aus. Er beobachtete teils auf bewegten, teils auf unbewegten Objektträgern 10 Minuten lang. Nach umfangreichen Versuchen, in denen die Testdichte, die Kochsalzkonzentration und die Temperatur geändert wurde, kam Kutzner zu folgenden Ergebnissen: Zur Anstellung der Reaktion eignet sich am besten eine Test von der 7fachen Dichte der Gebrauchstest für die S.L.A. — Eine Erhitzung der Test auf 70° C zur Abtötung der Erreger (B. Pullorum) setzt die Agglutinabilität der Bakterien herab. Die günstigste Kochsalzkonzentration zur Herstellung der Test liegt zwischen 0,85 und 4%. Der Temperatur kommt bei der Anstellung der Reaktion, soferne es sich nicht um abnorm niedere Temperaturen, bei denen keine Reaktion eintritt, handelt, ein besonderer Einfluss nicht zu.

Kutzner verwendete auch farbige Glasplatten und einen Zusatz von Farbmitteln zur Test, sah darin jedoch keine Vorteile. Dagegen konnte er durch Zusatz von Natriumzitrat und Kaliumoxalat zur Testflüssigkeit die Blutgerinnung hinauszögern. Dabei war das Natriumzitrat in 0,2 — 0,8%iger Konzentration dem Kaliumoxalat überlegen. Während nämlich bei letzterem die Proben nach 2 — 4 Minuten doch gerannen, konnte bei ersterem eine Gerinnung innerhalb 5 Minuten nicht beobachtet werden. Kutzner empfahl daher einen Zusatz von 0,2- bis 0,8%igem Natriumzitrat zur Test.

d. Methode nach Diernhofer.

Die Störung im Reaktionsablauf, hervorgerufen durch die Anwesenheit der roten Blutkörperchen und die häufig auftretende Blutgerinnung, versuchte Diernhofer (9) auszuschalten, ohne dabei

die spezifische Agglutinabilität der Test zu schädigen. Dies gelang ihm in sicherer und einfacher Weise dadurch, dass die Testbakterien (Abortusbazillen) nicht in physiologischer Kochsalzlösung, sondern in doppelt destilliertem Wasser aufgeschwemmt wurden und dieser Aufschwemmung noch Kalium-, Natrium- oder Ammoniumoxalatlösung in geringer Konzentration zugesetzt wurde. Nun zeigte sich aber, dass die Proben durch den gelösten Blutfarbstoff intensiv rot gefärbt wurden, was die Reaktion undeutlich machte. Diesen Nachteil suchte er durch Färben der Testbakterien mit Methylviolett, Karbolfuchsin oder basischem Viktoriablau zu beheben. Um eine „Echtfärbung" zu erreichen, empfahl Diernhofer eine Vorbeize der Bakterien mit Tannin oder ein Nachbeizen mit Jod oder Formalin. Die so vorbehandelte Bakterienmenge wurde mit der sechsfachen Menge aqua bidestillata aufgeschwemmt. Die Untersuchung wurde von Diernhofer in folgender Weise ausgeführt: Auf einen Objektträger wird je ein Tropfen gefärbte Test, Kalium-, Natrium- oder Ammoniumoxalatlösung und Frischblut gebracht, ohne Verzug verrührt und das Gemisch auf einer ovalen Fläche von 2×3 cm ausgestrichen. Die Ablesung erfolgt unter leichtem Hin- und Herneigen des Objektträgers über einem weissen Untergrund. Treten innerhalb von 20 Sekunden keine Flocken auf, so erfolgt leichtes Erwärmen der Probe auf Körpertemperatur; die Beobachtungsdauer beträgt 3 Minuten. Bei positivem Ergebnis traten an allen Stellen des Präparats gefärbte Bakterienflöckchen auf. Die Flüssigkeit zwischen den Flocken ist vollkommen klar und durchsichtig und hat die Farbe einer reinen Oxyhämoglobinlösung. Bei schwach positiven Proben zeigt sich noch leichte Trübung; bei negativen Proben tritt in keinem Falle Flockenbildung ein. Diernhofer empfiehlt die Reaktion zum Nachweis der Banginfektion beim Rind, Schwein und Meerschweinchen.

Andere Verfasser verwendeten zur Schnellagglutination statt Frischblut Blutserum.

II. Die Serumschnellagglutination.

Huddleson und Carlson führten die Serumschnellagglutination (nachfolgend mit S.S.A. bezeichnet) auf dem Objektträger aus, Noble im Reagenzglas. Die von Huddleson angegebene Technik hat den Vorteil grosser Einfachheit; die Versuchsanordnung nach Noble kommt dem Austitrierungsverfahren sehr nahe und soll deshalb grosse Genauigkeit besitzen.

a. Methode nach Huddleson.

Huddleson, Forest und Carlson (17) zogen 1926 die S.S.A. zum Nachweis der Banginfektion des Rindes bei. Ein Tropfen einer in üblicher Weise aus Abortuskulturen gewonnenen Testflüssigkeit wurde mit einem Tropfen Rinderserum auf einer Glasplatte innig vermischt. In positiven Fällen trat die Zusammenballung der Bakterien besonders bei geringer Erwärmung der Objektträger deutlich in Erscheinung und war nach einer Beobachtungszeit von 5 Minuten beendet. Die Ablesung der Reaktion geschah vor einem dunklen Hintergrund. Huddleson und Carlson hielten ihre Methode für so einfach und sicher, dass sie glaubten, sie ohne Bedenken in die Hand des Praktikers geben zu können. Sie betonten jedoch, dass zur Herstellung der Abortustest die Verwendung frisch gewachsener Bangkulturen und die Einstellung der Test auf eine bestimmte, nicht näher angegebene Dichte mit Hilfe besonderer Nephelometer unerlässlich sei. Später — 1928 — hat Huddleson zusammen mit Elizabeth Abell (18) seine Methode durch eine andere Herstellungsart der Test geändert. 72 Stunden lang auf Rinderleberagar von einem p_H-Gehalt von 6,6 üppig gewachsene Abortuskulturen wurden mit einer Lösung von 12% Kochsalz und 0,5% Phenol abgeschwemmt. 100 ccm der darauf filtrierten Test wurden mit 0,01 einer gesättigten wässrigen Gentianaviolettlösung versetzt. Hierauf wurde sie 10 Minuten lang gekocht und nochmals filtriert. Das Antigen musste von einem 1 : 500 positiv reagierenden Serum innerhalb 5 Minuten vollkommen agglutiniert werden. Mit dieser verbesserten Methode deckten sich die Ergebnisse der S.L.A. im wesentlichen. Runnels, Coon, Farley und Thorp (28) haben

die Methode nach Huddleson zum Nachweis der Pulloruminfektion der Hühner beigezogen und mischten Blutserum und Antigen auf einer erwärmten Glasplatte. Eickmann und Söntgen (11) haben die S.S.A. zur Ermittlung der Banginfektion an Meerschweinchen, die zu diagnostischen Zwecken mit brucellahaltigem Material geimpft waren, angewandt. Sie verrieben eine Platinöse Meerschweinchenserum mit der doppelten Menge frischer Abortuskultur auf einem Objektträger. Meerschweinchen, die bei der S.L.A. einen Titer von 1:5 aufwiesen, konnten bei dieser Methode bereits erkannt werden. Auch Bevan (4) wies auf die Methode nach Huddleson hin. Wenn man die Seren in Mengen von 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 und 0,005 nicht in Agglutinationsröhrchen, sondern auf dem Objektträger mit der Test vermengte, so begann bei Beobachtung der Proben unter dem Mikroskop die Flockung unmittelbar nach Versuchsanstellung und war bereits nach 5 Minuten beendet. Bei 200 untersuchten Proben stimmten die Ergebnisse nach der Methode von Huddleson mit seinen früher mit dem Abortoskop erzielten Versuchsresultaten überein. Lienhardt und Kitselman (20) bedienten sich dieser Methode ebenfalls zum Nachweis des Rinderabortus. Auf gefelderte Glasplatten wurden nicht näher angegebene Serumverdünnungen gebracht und mit Test versetzt. Die Sicherheit der Reaktion wurde durch Erwärmung der Glasplatten auf Körpertemperatur erhöht. Vergleichsuntersuchungen mit der S.L.A. deckten sich in allen Fällen. Damon (7) machte ebenfalls Vergleichsversuche und fand, dass die Schnellmethode wesentlich empfindlicher ist als die Langsammethode, forderte jedoch ein genau standardisiertes Antigen. Ferner haben Palmer und Baker (26) neben der Langsamagglutination die S.S.A. beigezogen. Einzelheiten über ihre Versuchsanstellung sind nicht bekannt. Verfasser haben darauf hingewiesen, dass die zur S.S.A. verwendeten Seren ebenso wie die Test vor Anstellung der Proben auf Zimmertemperatur anzuwärmen sind, da bei Verwendung kalter Reagenzien die Reaktion eine Verzögerung erleidet. Als positiv wurden lediglich jene Reaktionen angesprochen, die innerhalb 5 Minuten deutliche Flockenbildung zeigten. Die Ergebnisse der S.L.A. und der S.S.A. stimmten in 97,5% der Fälle überein. Ein Vergleich der S.L.A. mit der S.S.A.

nach Huddleson durch Graham, Robert und Frank Thorp jr. (15) bei der serologischen Diagnose brucellainfizierter Rinder ergab ebenfalls die Brauchbarkeit der S.S.A. Neben diesen günstigen Mitteilungen über die S.S.A. finden sich im Schrifttum auch mehr oder weniger einschränkende und ungünstige Urteile. Während Miessner und Berge (21) bei Ermittlung der Pulloruminfektion der Hühner mit der S.S.A. zu viel positive Ergebnisse feststellten, bekam Gwatkin (16) bei der Bangerkrankung des Rindes 10% Fehlergebnisse derart, dass die S.S.A. bei 10 einwandfrei positiven und bei 6 sicher negativen Seren vollkommen versagte. Nach Gwatkin können der Grad der Erwärmung, ein mehr oder weniger intensives Schütteln der Proben und die verschieden grosse Ausbreitung des Serum-Antigen-Gemisches auf dem Objektträger die Reaktion wesentlich beeinflussen. Donham und Fitsch (10) beobachteten bei der Verwendung der S.S.A. zum Nachweis der Bangschen Infektion des Rindes, dass eine Beobachtungszeit von 2—5 Minuten, wie sie bislang im allgemeinen eingehalten wurde, nicht immer ausreichend ist, und hielten eine solche von 8—10 Minuten für unerlässlich. Unter diesen Umständen bedeutet die S.S.A. aber keine wesentliche Zeitersparnis. In neuester Zeit hat Schmid (30) die Methode nach Huddleson zur Diagnose des Abortus Bang nachgeprüft. Auf eine durch eine Glühbirne erwärmte Glasplatte, welche in mehrere Felder geteilt war, verbrachte Schmid Serummengen von 0,08 bis 0,01 und setzte jeweils 0,03 ccm Test zu. Bei hoch agglutinierenden Seren trat zumeist schon in der ersten Minute eine deutlich erkennbare Agglutination ein. Schmid glaubt bei einer Beobachtungszeit von 4—5 Minuten auch langsam agglutinierende Seren noch erfassen zu können. Im Gegensatz zu Gwatkin, Donham und Fitsch stellt nach Schmid die von Huddleson vorgeschlagene S.S.A. einen nahezu vollwertigen Ersatz der S.L.A. dar. Auch Zeynelabedin (36) führte die S.S.A. zur Erkennung des infektiösen Abortus des Rindes durch. Zur Erzielung gleichmässiger Temperaturen bediente er sich eines heizbaren Holzkastens mit Glasdeckel. Zum Ausstreichen von Serum und Test verwendete er einen leicht zu reinigenden Metallspatel; als Test 48stündige abgetötete Kulturen gut agglutinabler Stämme, die mit

je 10 ccm einer 12%igen Kochsalzlösung und einem Zusatz von 0,5% Karbolsäure abgeschwemmt wurden. Die Abschwemmung wird kurze Zeit mit Glasperlen geschüttelt und hierauf durch Watte filtriert. Am geeignetsten erscheint eine Mischung von Serum und Antigen im Verhältnis 1 : 2 bzw. 1 : 2,5 und eine Temperatur von 22—25°. Im Eisschrank aufbewahrtes Antigen muss vor seiner Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht werden. Die Versuche ergaben, dass agglutinierende Sera mit hohen Titern schnell und eindeutig positive Ergebnisse zeitigen, während solche mit einem Titer 1 : 100 erst nach 10 Minuten langer Beobachtungszeit Ausflockung zeigen und Agglutinationstiter von 1 : 50 und darunter überhaupt nicht mehr zu erfassen sind.

b. Methode nach Noble.

Noble (24 und 25) veröffentlichte 1927 eine Serumschnellagglutinationsmethode, die mit konzentrierter Bakterienaufschwemmung ausgeführt wurde. Er zog sie zur Diagnose des Typhus, Paratyphus, der Pneumokokken, der Meningokokken und des Milzbrandes bei. Noble schüttelte in einem Reagenzglas 0,1 ccm Serum oder Serumverdünnung (1 : 2 bis 1 : 10) mit der gleichen Menge konzentrierter Bakterienemulsion während 2 Minuten durch. Vor dem Ablesen wurde die Flüssigkeitsmenge mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt. Der Methode soll grosse Genauigkeit und Empfindlichkeit zukommen. Später haben Troisky und Mayofis (33) die von Noble angegebene Methode ebenfalls zur Diagnose des Typhus und Paratyphus benützt. Sie stellten dabei fest, dass die Schnellmethode in ca. 20% der Fälle der Widal-Reaktion überlegen ist. Awerbuch (1) hat die guten Ergebnisse Nobles bei der Typhus- und Paratyphusdiagnose bestätigt. Celny (1), welcher die Methode von Noble gleichfalls bei Typhus und Paratyphus prüfte, will beobachtet haben, dass mit dieser Methode Gruppenreaktionen in Wegfall kommen. Ginsburg (1) zog die Schnellmethode zur Diagnose von Typhus, Paratyphus, Gonokokken, Meningokokken, Pneumokokken und Dysenterie bei. Er befürwortete ebenso wie Fedoroff (1), der die Methode bei Bazillus pestis und bei Bazillus pseudotuberculosis rodentium anwandte,

und Reginskaja (1) die Brauchbarkeit der Noble'schen Reaktion. Schurnakowa (31) bediente sich 1933 der Technik nach Noble zum Nachweis der Banginfektion des Rindes. Er untersuchte über 1000 Seren und hat zum Vergleich die S.L.A. durchgeführt. Das Untersuchungsserum wurde in Verdünnungen von 1 : 2,5, 1 : 5 und 1 : 10 im Reagenzglas mit 4tägiger, gut agglutinabler, lebender Kultur als Test zusammengebracht. Nach gründlichem Durchschütteln (10—20 Minuten lang im Schüttelapparat) und Ergänzung des Serumtestgemisches mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm wurde das Ergebnis abgelesen. Agglutinationen in Serumverdünnungen 1 : 2,5 wurden als negativ, solche von 1 : 5 als fraglich und solche von 1 : 10 als positiv angesprochen. Schurnakowa fand, dass die von Noble angegebene Schnellmethode die gewöhnliche Agglutinationsmethode an Sicherheit und Raschheit übertrifft.

Statt Frischblut und Blutserum wurde von einzelnen Forschern auch angetrocknetes Blut zur Schnellagglutination verwendet.

III. Die Trockenblutschnellagglutination.

Erstmals von Miessner und Berge und später von Bianchini wurde an Papierstreifen angetrocknetes Blut in Kochsalzlösung ausgezogen. Dieses Extrakt wurde mit Test auf dem Objektträger vermischt.

Methode nach Miessner und Berge.

Zur Anstellung der Reaktion verbrachten Miessner und Berge (21) das an Filtrierpapier angetrocknete Blut in 0,5 ccm physiologische Kochsalzlösung, um es darin während 30 Minuten bei Zimmertemperatur auszulaugen. Von diesem Auszug wurde 1 Tropfen mit einem gleich grossen Tropfen Test auf einem Objektträger vermengt und 5—10 Minuten beobachtet. Die Ergebnisse dürften kaum befriedigt haben, da die Nachahmung dieser Methode nicht empfohlen wird. Auch Bianchini (5) bezeichnete die Trockenblutschnellagglutination nur als Notbehelf, da ihr natürlicherweise die grösste Unsicherheit anhaftet.

Somit kommt der Trockenblutschnellagglutination eine praktische Bedeutung nicht zu.

Von den bisher aufgeführten Schnellagglutinationsmethoden wurde die Methode nach Bass und Watkins, ferner die nach Diernhofer und die Methode nach Huddleson zum Nachweis der Banginfektion beim Meerschweinchen beigezogen.

Die Methode nach Bass und Watkins wurde von Ali Ekrem (12) zum Studium von Brucellaagglutininen beim Meerschweinchen benützt. Die Versuchsergebnisse Ali Ekrems bewiesen, dass sich die Methode zur Feststellung der Banginfektion des Meerschweinchens deshalb schlecht eigne, weil Titer von 1 : 10 bis 1 : 300 in keinem Falle und solche von 1 : 300 bis 1 : 800 nur lückenhaft erfasst werden können.

Diernhofer (9) prüfte seine Methode nur an einem kleinen Versuchsmaterial, aber mit dem Ergebnis, dass sie sehr verlässliche Resultate zu liefern vermag. Er empfahl die F.S.A. auch deshalb, weil hiezu nur geringe Blutmengen benötigt sind und somit die Methode in beliebig kurzen Zwischenräumen auch an Kleintieren anwendbar ist.

Die Methode nach Huddleson wurde von Eickmann und Söntgen (11) zur beschleunigten Feststellung der Abortusinfektion bei infizierten Meerschweinchen angeraten.

Durch die Veterinärpolizeiliche Anstalt wurde mir die Aufgabe gestellt, zum Nachweis von Banginfektionen beim Meerschweinchen ein Schnellagglutinationsverfahren zu versuchen. Die Versuchsmeerschweinchen werden in der Anstalt mit bangbazillenhaltigem oder verdächtigem Material geimpft und später auf das Vorhandensein von spezifischen Immunkörpern im Blut untersucht. Hiezu diente bislang die gewöhnliche Serumagglutination. Dieses Verfahren hat aber, wie eingangs schon erwähnt wurde, den Nachteil, dass es umständlich ist, dass das Ergebnis erst nach Stunden vorliegt, dass den Versuchstieren verhältnismässig viel Blut entnommen werden muss, dass es wegen des öfteren Blutentzugs für das Kleintier nicht ohne Gefahr ist und deshalb eine häufige Wiederholung nicht gestattet, und dass die Blutgewinnung selbst bei öfterer Vornahme Schwierigkeiten bereiten kann. Deshalb schien es geboten, nach einem Verfahren zu suchen, dem diese Nachteile nicht im gleichen Masse anhaften.

Hiezu schien mir nach den Erfahrungen, die über die bisher geübten einschlägigen Schnellagglutinationsmethoden bekannt waren, am ehesten die Diernhofer'sche Methode geeignet zu sein. Sie ist ziemlich einfach und erfordert nur wenig Zeit und Material; durch Verwendung gerinnungshemmender Substanzen ist die störende Blutgerinnung ausgeschaltet; die Blutkörperchen selbt treten, weil gelöst, nicht in Erscheinung. Andererseits sind die Testbakterien durch ihre Färbung besonders hervorgehoben und erleichtern die Beurteilung der Reaktion. Endlich benötigt sie, was besonders wertvoll ist, lediglich Frischblut in kleinsten Mengen, so dass wiederholte Blutentnahmen an kleinen Versuchstieren ohne weiteres durchführbar sind. Damit kann die Blutuntersuchung fast beliebig oft wiederholt werden.

Den nachfolgend beschriebenen eigenen Versuchen wurde daher das Verfahren Diernhofers zu Grunde gelegt.

Gleichzeitig sollte geprüft werden, welche Leistungsfähigkeit dem Verfahren — verglichen mit der Serumlangsamagglutination — zukommt, und ob seine Brauchbarkeit durch Änderung der Technik in dem oder jenem Punkt noch erhöht werden kann.

B. Eigene Versuche.

Wie bereits früher ausgeführt, brachte Diernhofer je einen Tropfen Bakterienaufschwemmung, ferner einen Tropfen 0,4%ige Oxalatlösung, sowie einen Tropfen Ohrvenenblut auf eine reine Glasplatte, verrührte unverzüglich die 3 Tropfen und breitete das Gemisch auf ovaler Fläche von 2×3 cm aus. Die Beobachtung erfolgte nach leichtem Hin- und Herneigen der Glasplatte über einem weissen Untergrund. Traten dabei rasch blaue Flocken in grosser Zahl auf, die sich bei sanftem Schlingern der Glasplatte in Form eines Kranzes am Rande ansammelten, so war die Probe positiv. Zeigten sich jedoch innerhalb 20 Sekunden keine Flocken, so erwärmte Diernhofer die Probe über einer kleinen Flamme auf ungefähr Körpertemperatur. Erschienen nunmehr blaue Flocken in grosser Anzahl, so wurde die Reaktion ebenfalls als positiv be-

zeichnet. Kam eine Flockenbildung dagegen innerhalb von 3 Minuten nicht zustande, so galt die Reaktion als negativ. Eine Reaktion war zweifelhaft, wenn die Flöckchen sehr spät entstanden, klein blieben und die übrige Flüssigkeit recht wenig aufklarte.

In den folgenden von mir durchgeführten Versuchen hielt ich mich an nachstehend beschriebene

Versuchstechnik.

Soweit hievon Abweichungen erforderlich erschienen, ist dies bei den einzelnen Versuchen eigens angeführt.

Als Blutspender dienten mit Bangbazillen vorbehandelte und nicht vorbehandelte Meerschweinchen. Erstere erhielten 1,0 ccm Bangbazillenabschwemmung (1 Schrägagarkultur + 10 ccm sterile physiolog. Kochsalzlösung) i. p. einverleibt und zeigten bei der Serumlangsamagglutination gewöhnlich nach 5 Tagen Titer von 1 : 5 bis 1 : 50, nach 10 Tagen und später 1 : 100 und mehr. Auf diese Weise standen zu den einzelnen Versuchen jeweils Meerschweinchen mit verschiedenen hohen Agglutinationstitern zur Verfügung.

a. Die Blutentnahme.

Das für die Frischblutschnellagglutination benötigte Blut der Versuchsmeerschweinchen wurde in folgender Weise gewonnen: Nach Abscheren der Haare an einer Ohrmuschel wurde diese mit etwas Watte und einem Tropfen Xylol gründlich gereinigt, wodurch gleichzeitig eine nicht unbedeutende Hyperämie entstand. Dann wurde über einer mattierten Glühlampe in der Ohrmuschel ein kleines Randgefäss aufgesucht und mit einer Rasierklinge leicht angeschnitten. Der ausgetretene Bluttropfen wurde mit einer ca 1 mm weiten Glaskapillare abgesaugt und auf den Objektträger verbracht. Bei Verwendung annähernd gleich weiter Kapillaren gelang es durch senkrechtes Aufstellen der Kapillare leicht, einheitlich grosse Tropfen von etwa 0,02 ccm auf den Objektträger zu verbringen.

Das für die Serumlangsamagglutination benötigte Blut wurde mit einer Wasserstrahlsaugluftpumpe nach Einschneiden der Ohrvene in Mengen von 2 bis 3 ccm pro Versuchstier gewonnen. Die abgesaugte Blutmenge wurde hierauf in Agglutinationsröhrchen

gebracht. Nach dem Gerinnen wurde der Blutkuchen von der Glaswand abgestossen und zur Gewinnung klaren Serums während 30 Minuten bei 900 Umdrehungen pro Minute geschleudert.

b. Die Testflüssigkeit für die F.S.A.

Die Test wurde in allen Fällen durch Abschwemmen 48stündiger Bangkulturen von Traubenzuckerglyzerinleberschrägagar hergestellt. [Pferdeleberwasser (1 Pfund Pferdeleber + 1 Liter Leitungswasser) + 2% Pepton + 0,3% Kochsalz + 0,2% Natrium phosphoricum + 2,5% Agar + 2% Glyzerin und 0,5% Traubenzucker; p_H 7,4.]

Zur Abschwemmung wurden 2 ccm aqua bidestillata pro Röhrchen benützt. Die milchig dicke Bakterienabschwemmung wurde zur Entfernung grösserer Agarpartikelchen durch Glaswolle filtriert und hierauf während 15 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute ausgeschleudert. Die als Bodensatz erhaltene Bakterienmenge wurde durch Zusatz der 6fachen Menge aqua bidestillata aufgeschwemmt und gründlich vermischt.

Die in späteren Versuchen verwandten gefärbten Testflüssigkeiten wurden in der Weise hergestellt, dass die mit aqua bidestillata abgeschwemmten Abortusbazillen nach dem Filtrieren mit einem Farbmittel mit oder ohne Anwendung eines Beizverfahrens (Lugol'sche Lösung 1 : 2 : 300 bzw. 0,5%iges Formalin) versetzt wurden. Einzelheiten über die Herstellung der gefärbten Teste sind in den Versuchsanordnungen zu den einzelnen Versuchen aufgeführt.

Die im Kühlschrank bei 6—8° C aufbewahrten Teste wurden von ihrer Benützung durch Stehenlassen im Zimmer auf eine Temperatur von 18—20° C gebracht.

c. Die Oxalatlösung für die F.S.A.

Nachdem Diernhofer nicht angab, mit welcher Oxalatlösung er die Gerinnung des Blutes verhinderte, wurde in meinen Versuchen entweder Kalium- oder Natrium- oder Ammoniumoxalat in 0,4%iger wässeriger Lösung, oder auch eine Mischung der genannten Oxalatlösungen zu gleichen Teilen verwendet. [Lösung von 0,4 g des Oxalats in 100,0 aqua bidestillata unter Schütteln und allenfallsigem Erwärmen.]

d. Die Technik der F.S.A.

Sämtliche Untersuchungen wurden in nachfolgender, stets gleichbleibender Weise durchgeführt.

Auf einen fettfreien und gut gereinigten Objektträger wurde ein ca 0,02 ccm grosser Tropfen Oxalatlösung, etwa 1 cm davon entfernt ein annähernd gleich grosser Tropfen Test und dazwischen ein ebenfalls gleichgrosser Tropfen Blut verbracht. Anschliessend daran wird mit der Blutkapillare zuerst der Blut- mit dem Oxalattropfen, dann dieses Gemisch noch mit dem Testtropfen vermengt und auf 2×3 cm ausgestrichen.

e. Beobachtung und Beurteilung der F.S.A.

Die Beobachtung erfolgte sofort nach Anfertigung des Ausstriches über einem weissen Untergrund und dauerte im Gegensatz zu den Vorschlägen Diernhofers, der bereits nach 20 Sec. eine Erwärmung vorschlug, eine Minute. Trat während dieser Zeit keine gut sichtbare Flöckchenbildung ein, so wurde der Objektträger über der Sparflamme des Bunsenbrenners unter leichtem Hin- und Herneigen erwärmt und die Beobachtung weitere 2 Minuten fortgesetzt.

Flöckchenbildung bei vollkommen klarer und durchsichtiger Flüssigkeit galt als positive Reaktion, wobei Unterschiede in der Stärke der Reaktion mit + bis +++++ bewertet wurden. Bei verspätetem Auftreten der Flöckchenbildung, wobei die Flüssigkeit nicht vollkommen aufklarte, galt die Reaktion als zweifelhaft (?), bei fehlender Flöckchenbildung als negativ (—).

f. Die Technik der S.L.A.

Bei den durch Zentrifugieren klar erhaltenen Meerschweinchenseren wurde die Agglutination in den Verdünnungen 1 : 5 bis 1 : 4000 angesetzt. Zur Herstellung der Verdünnungen 1 : 5, 10, 20, 30 und 40 wurde 0,2, 0,1, 0,05, 0,03 und 0,02 unverdünntes Serum benützt. Für die Herstellung der Verdünnung 1 : 50, 75 und 100 wurde eine Grundverdünnung 1 : 10 beigezogen, von welcher die Mengen 0,2, 0,15 und 0,1 verwendet wurden. Für die Herstellung der Verdünnungen 1 : 200, 400, 600, 800, 1000, 2000 und 4000 wurde eine Grundverdünnung 1 : 40 verwendet, von welcher die Mengen

0,2, 0,1, 0,07, 0,05, 0,04, 0,02, und 0,01 gebraucht wurden. Die angegebenen Mengen des Serums oder der Serumverdünnungen wurden mit je 1,0 ccm Test versetzt, gründlich geschüttelt und während 24 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Die Ablesung der Agglutinationsproben erfolgte ohne Zuhilfenahme eines Agglutinoskopes. Es wurden nur vollkommene Agglutinationen (Fehlen der Punktbildung auf der Kuppe des Röhrchens) als positiv bezeichnet.

Versuch 1.

Diernhofer hat nicht angegeben, ob er zu seinen Untersuchungen Kalium-, Natrium- oder Ammoniumoxalat verwendete. Es galt daher zunächst festzustellen, ob jede der genannten Oxalatlösungen zu gleichwertigen Ergebnissen führt.

Versuchsanordnung: Verwendet wurden 10 vorbehandelte (Nr. 1 mit 10) und 5 nicht vorbehandelte (Nr. 1001 mit 1005) Meerschweinchen. Die F.S.A. wurde nebeneinander mit Kalium- bzw. Natrium- bzw. Ammoniumoxalatlösung und mit ungefärbter Test an sämtlichen Versuchstieren durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine von Diernhofer übersandte — anscheinend mit Methylviolett gefärbte — Originaltest, die von ihm als besonders geeignet bezeichnet war, beigezogen. Neben der F.S.A. wurde auch die S.L.A. zur Bestimmung des Agglutinationstiters der einzelnen Versuchstiere durchgeführt.

Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Aus der Tabelle ist ersichtlich: Von den 10 infizierten Meerschweinchen mit positiven Titern von 1 : 100 bis 1 : 1000 reagierten in der F.S.A. 8 Meerschweinchen eindeutig positiv. Diese positiven Reaktionen wurden gleichmässig bei jeder der drei Oxalatlösungen erhalten. Dabei können kleinste Schwankungen in der Stärke der Reaktion bei Meerschweinchen 1 und 10 als unwesentlich bezeichnet werden. Hinsichtlich der Zeitdauer bis zum Eintritt der positiven Reaktionen bestanden bei Verwendung der verschiedenen Oxalatlösungen keine bemerkenswerten Unterschiede. Die erzielten positiven Reaktionen traten zwischen 8 und 45 Sekunden auf. Eine Erwärmung der Proben erübrigte sich in sämtlichen positiven Fällen.

Tabelle 1.

Brauchbarkeit verschiedener Oxalatlösungen

Ms. Nr.	Titer i. d. S.L.A.	Frischblut + ungefärbte Test + 0,4%ige K = Ox. Lösung	Na = Ox. Lösung	NH_4 = Ox. Lösung
7	1 : 100	?	?	?
9	„	+++	+++	+++
2	1 : 200	++	++	++
4	„	++	++	++
5	„	—	—	?
6	„	+	+	+
8	„	++++	++++	++++
10	„	++	++	++
1	1 : 600	+	+++	+++
3	1 : 1000	+++	+++	+++
Kontrollen:				
1001	< 5	—	—	—
1002	< 5	—	—	—
1003	< 5	—	—	—
1004	< 5	—	—	—
1005	< 5	—	—	—

Wo die F.S.A. negativ oder fraglich ausfiel (Ms. 5 und 7 und die Kontrollen), lieferten sämtliche Oxalatlösungen annähernd gleiche Ergebnisse. Von Meerschweinchen 5 konnte mit Ammoniumoxalatlösung eine fragliche Reaktion erhalten werden, während die mit Kalium- und Natriumoxalatlösung angesetzten Proben eindeutig negativ waren. In diesen Fällen wurden die Proben 3 Minuten lang beobachtet und nach 1 Minute gelinde erwärmt.

Der Versuch zeigt, dass 0,4%ige Kalium- Natrium- und Ammoniumoxalatlösungen für die F.S.A. — abgesehen von unwesentlichen Schwankungen — gleich brauchbar sind.

In kleinen Zwischenversuchen wurde festgestellt, dass auch eine Mischung der genannten 3 Oxalatlösungen sich als brauchbar erwies. Dies gab Veranlassung, in sämtlichen folgenden Versuchen statt einer der 3 Lösungen deren Mischung zu verwenden.

Im Versuch 1 wurde auch Originaltest nach Diernhofer verwendet, so dass die Möglichkeit besteht, die mit ihr gewonnenen Ergebnisse mit jenen bei Verwendung ungefärbter Test in Vergleich zu ziehen.

Das Ergebnis bringt Tabelle 2.

Tabelle 2.

Brauchbarkeit von ungefärbter und gefärbter Test

Ms. Nr.	S. L. A.	F. S. A.	
		ungefärbte Test	Diernhofer gefärbte Originaltest
1	+ (600)	+	+
2	+ (200)	+	?
3	+ (1000)	+	+
4	+ (200)	+	?
5	+ (200)	— bzw. ?	—
6	+ (200)	+	+
7	+ (100)	?	+
8	+ (200)	+	+
9	+ (100)	+	+
10	+ (200)	+	+
Kontrollen			
1001	— (< 5)	—	—
1002	— (< 5)	—	—
1003	— (< 5)	—	—
1004	— (< 5)	—	—
1005	— (< 5)	—	—

Die Tabelle zeigt, dass von 10 Meerschweinchen mit Agglutinationstitern von 1:100 bis 1:1000 die F.S.A. mit ungefärbter Test in 8 Fällen, die F.S.A. mit gefärbter Test nur in 7 Fällen positive Reaktionen lieferte. Die F.S.A. mit ungefärbter Test stimmte mit der S.L.A. in 2 Fällen nicht überein und zwar beim Vorliegen eines Agglutinationstiters 1:100 bzw. 1:200. Die F.S.A. mit gefärbter Test ergab 2 mal ein fragliches und 1 mal ein einwandfrei negatives Ergebnis, jedesmal beim Titer 1:200. Diese Abweichung war auffallend, nachdem anderseits der niedere Titer 1:100 noch einwandfrei angezeigt wurde.

In diesem Versuch war demnach die von Diernhofer bezogene, gefärbte Originaltest der an der Anstalt hergestellten ungefärbten Test unterlegen.

Versuch 2.

Im Versuch 1 hat sich die ungefärbte Test gegenüber der gefärbten überlegen gezeigt, weshalb im folgenden Versuch die F.S.A. noch an einer grösseren Anzahl Meerschweinchen mit ungefärbter und gefärbter Test zum Vergleich durchgeführt wurde.

Versuchsanordnung. Es wurden 30 infizierte und 5 nicht infizierte Meerschweinchen verwendet. Als Test diente ungefärbte Test und gefärbte Originaltest nach Diernhofer. Zur Gerinnungsverhinderung wurde eine Mischung von 0,4%iger K-Na-NH_4 Oxalatlösung zu gleichen Teilen benützt. Neben der F.S.A. wurde die S.L.A. zur Bestimmung des Agglutinationstiters des Blutes der einzelnen Versuchstiere durchgeführt.

Versuchsergebnis. Dieses ist in nachfolgender Tabelle 3 zusammengefasst.

Aus der Tabelle ist ersichtlich: Von den 29 infizierten Meerschweinchen mit positiven Agglutinationstitern von 1:75 bis 1:2000 reagierten in der F.S.A. mit ungefärbter und gefärbter Test 28 eindeutig positiv. Bei diesen positiven Ergebnissen zeigte die gefärbte Originaltest nach Diernhofer insoferne eine Überlegenheit gegenüber der ungefärbten Test, als die Reaktionen bei der gefärbten Test wesentlich stärker und deutlicher waren. 10 schwachen Reaktionen (+) mit ungefärbter Test steht nur 1 schwache Reaktion bei gefärbter Test gegenüber. In der Versuchsgruppe mit ungefärbter Test finden sich 16 mittelstarke Reaktionen (++), in der Gruppe mit gefärbter Test 12 gleich starke Reaktionen. Deutlicher noch zeigt sich der Unterschied bei starken Reaktionen (+++). Während mit ungefärbter Test nur 2 starke Reaktionen erzielt wurden, gelang es mit gefärbter Test 15 starke Reaktionen festzustellen. Die Überlegenheit der gefärbten Test tritt demnach besonders in Fällen von schwachen und starken Reaktionen in Erscheinung. Eher gleicht sich die Leistungsfähigkeit beider Teste in Fällen mittelstarker Reaktionen, jedoch bleibt immer noch die ungefärbte Test unterlegen.

In Fällen, in denen die F.S.A. negative Reaktionen zeitigte (Ms. 33 und die Kontrollen), brachte die ungefärbte und gefärbte Test einheitlich negative Ergebnisse.

Hinsichtlich der Zeit, in der die positiven Reaktionen eintraten, bestand bei Verwendung ungefärbter und gefärbter Test kein wesentlicher Unterschied. Die Zeitspanne bis zum Eintritt der positiven Reaktionen betrug bei Verwendung ungefärbter Test 3 bis 30 Sekunden, bei Verwendung gefärbter Test 3 bis 25 Sekunden. Bei

Tabelle 3.

Brauchbarkeit von ungefärbter und gefärbter Test

Ms. Nr.	S. L. A.	F. S. A.	
		ungefärbte Test	gefärbte Test
33	1:75	—	—
20	1:100	+++	+
12	1:200	++	++
29	1:200	++	++
34	1:200	+	++
36	„	+	++
16	1:400	++	++
23	„	+	++
26	„	++	++
28	„	++	+++
11	1:600	+	++
24	„	+	++
25	„	+	++
30	„	+	++
32	„	+	++
37	„	+	++
39	„	+	++
40	„	++	++
13	1:800	+	++
15	„	++	++
19	„	++	++
35	„	++	++
38	„	++	+++
14	1:1000	++	++
21	„	++	++
22	„	++	++
27	„	++	++
31	„	++	++
18	1:2000	++	++
Kontrollen			
1006	< 5	—	—
1007	< 5	—	—
1008	< 5	—	—
1009	< 5	—	—
1010	< 5	—	—

negativem Ausfall der Proben wurde die Beobachtung auf 3 Minuten ausgedehnt und nach 1 Minute erfolgte eine gelinde Erwärmung.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse steht fest, dass für die F.S.A. die gefärbte Test der ungefärbten vorzuziehen ist.

Ein Vergleich der Ergebnisse der F.S.A. mit den Ergebnissen der S.L.A. im vorliegenden Versuch besagt, dass es sowohl mit ungefärbter als auch gefärbter Test gelingt, positive Agglutinationstiter von 1 : 100 bis 1 : 2000 zu erfassen. Ein Agglutinationstiter von 1 : 75 wurde durch die F.S.A. weder bei Verwendung von ungefärbter noch von gefärbter Test angezeigt.

Versuch 3.

Auf Grund der Überlegenheit der gefärbten Test wurde in den weiteren Versuchen nur gefärbte Test verwendet. Die von Diernhofer überlassene Originaltest war in den Versuchen 1 und 2 verbraucht worden. Im Versuch 3 wurde daher eine mit Methylenblau gefärbte, selbsthergestellte Test verwendet und mit der im Versuch 1 und 2 bereits benützten ungefärbten Test verglichen.

Versuchsanordnung: Es wurden 20 infizierte und 5 nichtinfizierte Meerschweinchen beigezogen. Als Test wurde ungefärbte und mit Methylenblau gefärbte verwendet. Die gefärbte Test wurde auf folgende Weise hergestellt: 16 Röhrchen 48stündiger Kulturen des Bang'schen Abortus Bazillus wurden mit je 2 ccm aqua bidestillata abgeschwemmt. Die Abschwemmung wurde unter ständigem Schütteln mit 30 Tropfen einer konzentrierten, wässerigen Methylenblaulösung gefärbt und dann mit 30 Tropfen Lugolscher Lösung gebeizt. Dabei nahmen die Abortusbazillen die Farbe kräftig an. Hierauf folgte filtration durch Glaswolle und 15 Minuten langes Ausschleudern bei 4000 Umdrehungen pro Minute. Der gut gefärbte Abortusbazillenbodensatz wurde mit ungefähr 30 ccm aqua bidestillata unter nochmaligem Zentrifugieren gewaschen und die Waschflüssigkeit hierauf vom Bodensatz sorgfältig abgegossen. Der dann verbleibende Bodensatz von 0,5 ccm wurde mit der 6fachen Menge aqua bidestillata aufgerührt. Die so erhaltene Test wurde in dünnem Aufstrich auf einem Objektträger mit Hilfe einer Lupe auf allenfalls aufgetretene Spontanagglutinationen untersucht. Sie war von homogener Beschaffenheit. Neben der F.S.A. wurde die S.L.A. zur Bestimmung des Agglutinationstiters des Blutes der einzelnen Versuchstiere durchgeführt.

Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4.

Brauchbarkeit einer mit Methylenblau gefärbten Test

Ms. Nr.	S. L. A.	F. S. A.	
		ungefärbte Test	Methylenblau-Test
27	1:100	+++	+++
33	„	+++	++
31	1:200	+++	+++
35	„	+++	+++
36	„	+++	+++
38	„	++	++
40	„	+	++
22	1:400	++	+
23	„	++	++
24	„	++	++
30	„	+++	+++
34	„	++	++
39	„	+	+
25	1:600	++	++
26	„	++	+++
32	„	+++	+++
37	„	++	++
21	1:1000	+	++
28	„	++	++
29	„	+++	+++
Kontrollen			
1011	< 5	—	—
1012	< 5	—	—
1013	< 5	—	—
1014	< 5	—	—
1015	< 5	—	—

Der Tabelle ist zu entnehmen: Von den 20 infizierten Meerschweinchen, welche Agglutinationstiter von 1 : 100 bis 1 : 1000 aufwiesen, lieferten sämtliche mit gefärbter Test eindeutig positive Ergebnisse. Diese Reaktionen traten im allgemeinen zwischen 3 und 25 Sekunden ein. Nur in einem Fall (Ms. 22) konnte die positive Reaktion erst nach Ablauf von 1 Minute festgestellt werden.

Die gleichzeitig mit ungefärbter Test an denselben Meerschweinchen angestellten Reaktionen stimmten in allen Fällen mit den bei gefärbter Test gewonnenen Ergebnissen überein; lediglich hinsichtlich der Reaktionsstärke bestanden kleine Unterschiede.

Der Versuch zeigt, dass die selbst hergestellte, mit Methylenblau gefärbte Test brauchbare Ergebnisse zu liefern vermochte.

Der Versuch ergab weiterhin, dass mit der mit Methylenblau gefärbten Test Agglutinationstiter von 1 : 100 bis 1 : 1000 mit Sicherheit erfasst werden konnten.

Versuch 4.

Durch den vorangegangenen Versuch stand fest, dass mit der mit Methylenblau gefärbten Test Agglutinationstiter 1 : 100 und darüber ermittelt werden konnten. Nunmehr sollte die Leistungsfähigkeit der F.S.A. auch beim Vorliegen von Agglutinationstitern unter 1 : 100 geprüft werden.

Versuchsanordnung: Zur Blutentnahme dienten 10 Meerschweinchen, welche erst 3 Tage vorher mit Bangkulturen infiziert waren und bei denen deshalb erwartet werden konnte, dass ihr Blut nur niedere Titer aufweisen würde. Zur Kontrolle wurden 3 nicht infizierte Meerschweinchen benützt. Die Reaktion wurde mit der im Versuch 3 geprüften Methylenblautest und vergleichsweise auch mit ungefärbter Test angestellt. Neben der F.S.A. wurde die S.L.A. zur Bestimmung der Agglutinationstiter der einzelnen Versuchstiere beigezogen.

Versuchsergebnis: Die S.L.A. ergab bei den 10 infizierten Meerschweinchen Agglutinationstiter von 1 : 5 (Ms. 43, 48, 50); 1 : 10 (Ms. 45, 47); 1 : 20 (Ms. 46); 1 : 30 (Ms. 41, 42); 1 : 40 (Ms. 49) und 1 : 50 (Ms. 44). Die F.S.A. zeitigte dagegen sowohl unter Benützung von gefärbter als auch nicht gefärbter Test in keinem Fall ein positives Ergebnis, obwohl die Beobachtung der nach einer Minute erwärmten Proben 3 Minuten lang durchgeführt wurde. Die F.S.A. an den Kontrollmeerschweinchen war negativ.

Der Versuch ergab, dass positive Agglutinationstiter von 1 : 5 bis 1 : 50 durch die F.S.A. bei Verwendung ungefärbter als auch einer mit Methylenblau gefärbten Test nicht erfasst werden konnten.

Versuch 5.

War bisher nur Methylenblau zur Bakterienfärbung verwendet worden, so sollten hiezu im folgenden andere Farbstoffe versucht werden.

Diernhofer hat schon auf die Färbung mit Viktoriablau hingewiesen.

Eine entsprechend seinem Vorschlag versuchte Färbung der Testbakterien mit diesem Farbstoff scheiterte aber wiederholt. Basisches Viktoriablau war nämlich weder in wässeriger (verdünnter oder konzentrierter) noch in alkoholischer Lösung brauchbar. Die Testbakterien färbten sich zwar auch ohne Zuhilfenahme eines Beizmittels (Lugol'sche Lösung 1 : 2 : 300 oder 0,5% ige Formalinlösung); es traten aber in sämtlichen Fällen — sowohl bei Verwendung von Stämmen verschiedener Herkunft, bei frisch aus Organen gezüchteten und älteren Laboratoriumsstämmen, als auch bei Erhitzung der Testbakterien im Wasserbad bis zur Siedetemperatur — unmittelbar nach dem Zusatz des Farbmittels zu den Bakterien Spontanagglutinationen auf. Neben basischem Viktoriablau wurde auch gewöhnliches Viktoriablau der Firma Grübler-Leipzig verwendet, erwies sich aber ebenso als unbrauchbar.

Die Bakterienfärbung erfolgte nun ausser mit Methylenblau auch mit Methylviolett, Karbolfuchsin, Bismarckbraun und Kristallviolett. Daneben wurde auch ungefärbte Test wie in den früheren Versuchen beigezogen.

Versuchsanordnung: Für den Versuch standen 6 infizierte und ein nicht infiziertes Meerschweinchen zur Verfügung. Die gefärbten Teste wurden auf folgende Weise hergestellt: 48stündige Schrägagarkulturen wurden mit je 2 ccm aqua bidestillata abgeschwemmt. Die Abschwemmung wurde durch Glaswolle filtriert und mit dem Farbstoff und allenfalls auch einem Beizmittel versetzt.

a) Die Methylenblautest: Sie war dieselbe wie im Versuch 3 und 4.

b) Die Methylviolettest: Zu 34 ccm Bazillenaufschwemmung wurden bis zur Sattfärbung 14 Tropfen wässerige konzentrierte Methylviolettlösung und 24 Tropfen Lugolsche Lösung (1 : 2 : 300) zugegeben.

c) Die Karbolfuchsintest: Zu 10 ccm Bazillenaufschwemmung wurden 30 Tropfen Karbolfuchsinlösung, wie sie bei der Färbung

nach Ziehl-Neelsen verwendet wird, und 10 Tropfen 0,5%ige Formalinlösung beigefügt.

d) Die Bismarckbrauntest: Zu 10 ccm Bazillenaufschwemmung wurden 10 Tropfen einer wässerigen, konzentrierten Bismarckbraunlösung und 5 Tropfen Lugolsche Lösung zugesetzt.

e) Die Kristallviolettest: Zu 12 ccm Bazillenaufschwemmung wurden 12 Tropfen einer 1%igen alkoholischen Kristallviolettlösung gegeben.

Unmittelbar nach der Färbung und Beizung wurden die Bazillenaufschwemmungen 15 Minuten lang bei 4000 Umdrehungen pro Minute geschleudert und die überstehende Flüssigkeit vom Bodensatz sorgfältig abgegossen. Der Bodensatz wurde dann mit annähernd 30 ccm aqua bidestillata unter nochmaligem Ausschleudern gewaschen und schliesslich mit der 6fachen Menge aqua bidestillata aufgeschwemmt. In den so erhaltenen Testflüssigkeiten waren die Bakterienleiber intensiv gefärbt und zeigten unter der Lupe keinerlei Spontanagglutination. Neben der F.S.A. wurde auch die S.L.A. zur Bestimmung des Agglutinationstiters der einzelnen Versuchstiere durchgeführt.

Versuchsergebnis: Die Ergebnisse der einzelnen Testflüssigkeiten unterschieden sich nur wenig voneinander, weshalb es angezeigt erscheint, die Brauchbarkeit auf Grund der Reaktionsstärke zu beurteilen. Hiezu dient Tabelle 5.

Tabelle 5.

Brauchbarkeit verschieden gefärbter Testflüssigkeiten

Art der Test	Meerschweinchen Nr.: 13	28	29	32	34	39	Sa.
Methylviolett-test	++++	+++++	+++	++	+++++	+++	23
Methylen-blautest	+	+++++	++	++	+++	+++	16
Carbol-fuchsintest	+++++	+++	+++++	+++	+++++	+++++	26
Bismarck-brauntest	++	+	+	++	++	+	9
Kristall-violettest	+++	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	27
Ungefärbte Test	++	+++	++	+	+++	+++	14

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass sich von den verschiedenen, gefärbten Testflüssigkeiten am besten die Kristallviolett- und die Karbolfuchsinfärbung eignete und auch die Methylviolettest noch brauchbare Ergebnisse lieferte. Dagegen haben die mit Methylenblau bzw. Bismarckbraun gefärbten Teste ebensowenig entsprochen wie die ungefärbte Test.

Der Versuch beweist, dass durch Zusätze von Farbstoffen die Agglutinabilität der Bangbakterien im allgemeinen nicht herabgesetzt wird, nachdem die ungefärbte Test den gefärbten Testflüssigkeiten fast durchweg unterlegen war. Jedenfalls kann der Kristallviolett- und Karbolfuchsinlösung insoferne eine besondere Bedeutung zugemessen werden, als dadurch die Beurteilung aufgetretener Agglutinationen bedeutend erleichtert wird. Sämtliche Reaktionen mit den verschiedenen Testflüssigkeiten waren zwischen 5 und 15 Sekunden eingetreten. Die an dem einen nicht infizierten Meerschweinchen durchgeführten Kontrollversuche waren in allen Fällen negativ.

Der Versuch ergab, dass die Verwendung einer mit Kristallviolettlösung gefärbten Test vorteilhaft ist. Annähernd gleich brauchbar erscheint auch eine Färbung der Testbakterien mit Karbolfuchsin oder Methylviolett. In der S.L.A. zeigten sämtliche Tiere Agglutinationstiter von 1:200 bis 1 : 800. Der Nachweis der Infektion konnte also durch die F.S.A. sowohl bei Verwendung ungefärbter Test als auch bei Benützung der mit verschiedenen Farblösungen gefärbten Teste in allen Fällen als erbracht gelten.

Versuch 6.

In den Versuchen 1 mit 5 wurde zur Herstellung der Test stets ein und derselbe ältere Laboratoriumsstamm verwendet. Es erschien nun wissenswert, ob bei Verwendung von verschiedenen Stämmen unter gleicher Versuchsanordnung auch gleiche Ergebnisse erzielt werden können. Zu diesem Zweck wurden zunächst 5 verschiedene ältere Laboratoriumsstämme an gleichen Versuchsmeerschweinchen vergleichsweise geprüft.

Versuchsanordnung: Es standen 30 infizierte und 3 nicht infizierte Meerschweinchen zur Verfügung. Es wurden 5 mit Kristall-

violettlösung gefärbte Teste aus den 5 Bakterienstämmen 33, 70, 112, 116 und 221 hergestellt. Die aufgeführten Bakterienstämme waren 1933 aus Föten und Eihäuten gezüchtet worden. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie alle vier Wochen auf Traubenzucker-glyzerinleberschrägagar weitergezüchtet. Die Herstellung der Teste erfolgte auf die im Versuch 5 näher beschriebene Art. Neben der F.S.A. wurde die S.L.A. zur Bestimmung des Agglutinationstiters der einzelnen Versuchstiere durchgeführt.

Versuchsergebnis: Die 5 Teste, welche aus 5 älteren Laboratoriumsstämmen hergestellt waren, arbeiteten ungleichmässig. Die Beurteilung der Brauchbarkeit der einzelnen Teste erfolgte — wie im vorigen Versuch — wieder am besten durch Berücksichtigung der Stärke der Reaktion und ferner durch die Ermittlung, inwieweit auch niedere Bluttiter erfasst wurden. Vgl. Tabelle 6. Allenfalls kann auch noch die Berücksichtigung der Zeit, in der die Reaktionen eintraten, und die Notwendigkeit einer Erwärmung Anhaltspunkte für die Beurteilung der Reaktion geben.

Aus der Tabelle ist ersichtlich: Die Versuchsmeerschweinchen wiesen Agglutinationstiter von 1 : 30 bis 1 : 1000 auf. 2 Agglutinationstiter von 1 : 30, 1 Titer 1 : 50 und 2 Titer 1 : 100 wurden in keinem Fall erfasst. Für die Beurteilung verbleiben demnach die Reaktionen an 25 infizierten Meerschweinchen. Während mit Test aus Stamm 33, 116 und 221 die Infektion nur bei je 22 Meerschweinchen und bei Test aus Stamm 70 nur bei 20 bestätigt wurde, gelang es mit Test aus Stamm 112, 24 infizierte Meerschweinchen festzustellen. Bewertet man die Reaktionen hinsichtlich ihrer Stärke, so ergibt sich für Test aus Stamm 33 die Punktzahl 49, aus Stamm 70 53, aus Stamm 112 68, aus Stamm 116 56 und aus Stamm 221 die Punktzahl 49. Somit arbeitete Stamm 112 am besten; weniger gut die Stämme 116 und 70; am wenigsten entsprachen die Stämme 33 und 221.

Beurteilt man die Stämme danach, in welchem Umfang sie die niederen Agglutinationstiter (1 : 100 und weniger) noch zu erfassen vermögen, so steht ebenfalls Stamm 112 an erster Stelle. Durch ihn wurden 8 Meerschweinchen in der angegebenen Titergrenze erfasst, von den übrigen 5 Stämmen dagegen nur je 6.

Tabelle 6.

Eignung verschiedener älterer Laboratoriumsstämme

Ms. Nr.	Ergebn. d. S. L. A.	Ergebnisse der F. S. A. mit Stamm 33	70	112	116	221
72	1:30	—	—	—	—	—
80	„	—	—	—	—	—
76	1:50	—	—	—	—	—
58	1:75	++	++++	+	++	+++
73	„	—	—	+++	—	—
79	„	—	—	+++	—	—
23	1:100	+++	+	++++	+++	+++
56	„	++++	+++	+++	+++	+
59	„	+	+	+++	+	++
60	„	+	+	+++	+	++
71	„	—	?	—	—	—
74	„	—	?	?	—	+
75	„	+	+	++	+	—
78	„	—	—	—	—	—
51	1:200	+++	+++	+++	+++	+++
52	„	+	—	+++	+	++
53	„	+	++++	++	++	+++
55	„	+++	++	++	++	+
57	„	++	++	+++	++	+
22	„	+++	+++	++	+++	+++
77	„	+	—	+	+	+
25	1:400	++++++	++	++++	++++	+
29	„	++	++	++	++	++
34	„	++	++	++	++	++
54	„	++	+	++	+	+
21	1:600	++	++	++	++	++
28	„	++	+++	++	+	+++
24	1:800	++	++	++	++	++
26	„	++	+	++	+	+
32	1:1000	+	+++++	++++	++++	++++

Folglich war die Test aus Stamm 112 hinsichtlich der Reaktionsbreite und Reaktionsstärke den übrigen 4 Testflüssigkeiten überlegen.

Was die Zeit, in der die einzelnen Reaktionen auftraten, betrifft, so zeigte auch hierin Test aus Stamm 112 eine Überlegenheit. Mit ihm traten die positiven Reaktionen in 5 Sekunden bis 1 Minute auf. Mit Test der übrigen Stämme waren die Reaktionen erst zwischen 5 Sekunden und $1^1/_2$ Minuten (Stamm 33) bzw. $2^1/_2$ Min. (Stamm 116 und 221) bzw. 3 Min. (Stamm 70) deutlich ablesbar.

Eine Erwärmung nach 1 Minute bei positiven Reaktionen war mit Test des Stammes 116 in einem Fall, der Stämme 33 und 70 in 2 Fällen und des Stammes 221 in 3 Fällen notwendig. Dagegen war bei Verwendung von Test aus Stamm 112 in positiven Fällen eine Erwärmung der Proben nicht erforderlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass verschiedene, aber auf gleiche Weise aus älteren Laboratoriumsstämmen hergestellte Testflüssigkeiten nicht gleich brauchbar sind, sondern dass sie in ihrer Agglutinabilität nicht unwesentliche Unterschiede aufweisen können.

Die 3 nicht infizierten Meerschweinchen reagierten bei Verwendung der verschiedenen Testflüssigkeiten in allen Fällen negativ.

Als bemerkenswert sei noch erwähnt, dass die Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Stamm 70 durchgeführt wurde und deshalb eigentlich zu erwarten gewesen wäre, dass die homologe Test aus diesem Stamm 70 auch die besten Ergebnisse liefern würde.

Versuch 7.

Nachdem die Teste aus den Stämmen 112 und 116 stärkere Agglutinabilität als die übrigen aufwiesen, soll im folgenden Versuch die Brauchbarkeit einer aus beiden hergestellten Mischtest geprüft werden. Zum Vergleich wurden die aus jedem einzelnen dieser Stämme hergestellten Teste beigezogen.

Versuchsanordnung: Es standen 25 infizierte und 2 nicht infizierte Meerschweinchen zur Verfügung. Die Teste aus den Stämmen 112 und 116 wurden ebenso wie die Mischtest in der bereits früher angegebenen Weise hergestellt und mit Kristallviolett gefärbt. Zur Bestimmung des Agglutinationstiters der einzelnen Versuchstiere wurde die S.L.A. beigezogen.

Die Versuchsergebnisse sind in nachfolgender Tabelle 7 einander gegenüber gestellt.

Aus der Tabelle ist ersichtlich: Die Versuchsmeerschweinchen hatten Agglutinationstiter von 1 : 5 bis 1 : 1000. Die beiden Agglutinationstiter von 1 : 5 und die beiden von 1 : 30 wurden mit keiner der verschiedenen Teste erfasst. Von 4 Titern 1 : 10 und

Tabelle 7.

Brauchbarkeit einer Mischtest

Ms. Nr.	S.L.A.	F.S.A. Stamm 112	F.S.A. Stamm 116	F.S.A. Stamm 112+116
81	1:5	—	—	—
88	„	—	—	—
82	1:10	+++	—	—
84	„	—	—	—
87	„	—	—	—
89	„	—	—	—
86	1:20	—	—	—
90	„	+++	—	+
83	1:30	—	—	—
85	„	—	—	—
76	1:50	+	+	+
62	1:75	++	++	++
70	„	++	++	++
61	1:100	++	++	++
64	„	++	+	++
67	„	++	+	++
68	„	+	+	+
77	„	++	++	++
72	1:200	++	+	+
73	„	++	+	++
66	1:400	++	++	++
69	„	++	+	+
74	„	++	+	++
78	1:800	++	+	+
65	1:1000	++	++	++

von 2 Titern 1 : 20 wurde je nur einer erfasst und zwar durch die Mischtest ein Titer 1 : 20. Erst die Titer von 1 : 50 aufwärts wurden von sämtlichen 3 verwendeten Testflüssigkeiten ermittelt. Test aus Stamm 112 lieferte deshalb wesentlich bessere Ergebnisse als die Testflüssigkeit aus Stamm 116 bzw. die Mischtest. Diese Überlegenheit zeigte sich sowohl in der Erfassung der niederen Titer als auch in der Stärke der Reaktionen.

Hinsichtlich der Zeit, in der die positiven Reaktionen auftraten, bestehen in diesem Versuch keinerlei Unterschiede. Deutlich ablesbar positive Reaktionen erschienen zwischen 5 Sekunden und $2^1/_2$ Minuten. Eine Erwärmung bei positiven Reaktionen wurde notwendig bei Verwendung des Stammes 112 in 2 Fällen, des Stammes 116 in 1 Fall und der Mischtest in 2 Fällen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Test aus Stamm 112 der Mischtest in ihrer Leistungsfähigkeit in jeder Beziehung überlegen war.

Bei den nicht infizierten Meerschweinchen verliefen die Reaktionen stets negativ.

Versuch 8.

In den beiden letzten Versuchen hat sich dieser („ältere") Bangbazillenstamm 112 zur Testflüssigkeitsherstellung besonders bewährt. Die Erfassung der niederen Titer war aber immerhin noch recht lückenhaft. Es galt deshalb festzustellen, ob nicht durch Verwendung von verdünnten Testflüssigkeiten die Leistungsfähigkeit in dieser Hinsicht gesteigert werden könnte.

Versuchsanordnung: Es standen 30 infizierte und 2 nicht infizierte Meerschweinchen zur Verfügung. Zum Versuch wurde wie früher hergestellte und mit Kristallviolett gefärbte Test aus Stamm 112 benützt und zwar unverdünnt und mit der gleichen, doppelten und dreifachen Menge aqua bidestillata verdünnt. Die S.L.A. wurde zur Bestimmung des Agglutinationstiters des Blutes der einzelnen Versuchstiere beigezogen.

Das Versuchsergebnis ist aus nachfolgender Tabelle 8 ersichtlich.

Die Tabelle zeigt: Die Meerschweinchen hatten Titer von 1 : 5 bis 1 : 4000. Agglutinationstiter von 1 : 5 (in 3 Fällen), 1 : 10 (in 3 Fällen) sowie je 1 Agglutinationstiter 1 : 20 und 1 : 30 wurden nicht erfasst, dagegen ein zweiter Agglutinationstiter 1 : 20 und dann die Titer von 1 : 40 bis 1 : 4000 lückenlos. Für die Beurteilung verbleiben die positiven Reaktionen an 22 Meerschweinchen. Da die Infektion bei den genannten 22 Meerschweinchen sowohl durch die unverdünnte Test, als auch durch die verschiedenen Testverdünnungen durchwegs erkannt wurde, bestehen hinsichtlich der blossen Erfassung niederer Titer keine Unterschiede. Wohl aber bestehen solche hinsichtlich der Stärke der Reaktion. Von diesem Gesichtspunkt aus ist die Verdünnung 1 : 1 der unverdünnten und der im Verhältnis 1 : 2 bzw. 1 : 3 verdünnten Test wesentlich überlegen. Besonders auffallend war die sehr starke Reaktion, welche bei einem Titer 1 : 20 mit der Testverdünnung 1 : 1 noch erzielt wurde.

Tabelle 8.

Brauchbarkeit von verdünnter Test

Ms. Nr.	S.L.A.	F. S. A. mit Test			
		unverdünnt	verd. 1:1	verd. 1:2	verd. 1:3
91	1:5	—	—	—	—
98	„	—	—	—	—
100	„	—	—	—	—
93	1:10	—	—	—	—
95	„	—	—	—	—
97	„	—	—	—	—
92	1:20	—	—	—	—
96	„	+	++++	++	+
99	1:30	—	—	?	—
94	1:40	++++	++++	+++	++
31	1:100	+++	+++	+++	+++
38	„	++++	++++	++++	++++
86	„	++++	++++	++++	++++
87	„	++++	++++	++++	+++
32	1:200	++++	++++	++++	++++
35	„	++++	++++	++++	++++
82	„	+++	+++	+	+++
89	„	+	++++	+++	+++
33	1:400	+++	++++	+++	++++
39	„	++++	++++	++++	+++
81	„	++++	++++	+++	+++
88	„	++++	++++	+++	+
90	„	+++	++++	+++	+++
84	1:600	+	++++	+++	+++
34	1:800	++++	++++	++++	++++
83	„	++++	++++	++++	++++
37	1:1000	++++	++++	++++	++++
85	„	++++	++++	++++	++++
36	1:2000	++++	++++	++++	++++
40	1:4000	++++	++++	++++	++++

Hinsichtlich der Zeit, in der die positiven Reaktionen auftraten, bestanden keine bedeutenden Unterschiede. Innerhalb 2 Sekunden und $2^1/_2$ Minuten waren positive Reaktionen ablesbar.

Auch hinsichtlich der Notwendigkeit, die Proben in positiven Fällen zu erwärmen, waren keine nennenswerten Abweichungen vorhanden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Verwendung von verdünnten Testflüssigkeiten auf die Reaktionsbreite keinen Einfluss ausübt. Dagegen gelang es mit einer Testflüssigkeit, die statt unverdünnt im Ver-

hältnis 1 : 1 angewendet wird, deutlichere (stärkere) Agglutination zu bekommen.

Die Untersuchungen an den nicht infizierten Meerschweinchen verliefen in allen Fällen negativ.

Versuch 9.

Wurden bisher „ältere" Laboratoriumsstämme zur Herstellung verwendet, so schien es unter Verwertung der bisher gewonnenen Erfahrungen angezeigt, nunmehr auch aus Föten und Eihäuten „frisch isolierte" Stämme beizuziehen. Während der Dauer meiner Versuche gelang es, 2 kräftig wachsende, in der S.L.A. gut agglutinierende und für den Versuch geeignet erscheinende Bangbazillenstämme zu isolieren (126 und 146).

Versuchsanordnung: Es standen 17 infizierte und 2 nicht infizierte Meerschweinchen zur Verfügung. Die mit Kristallviolett gefärbten Teste waren aus den Bakterienstämmen 126 und 146 hergestellt und kamen unverdünnt und zu gleichen Teilen mit aqua bidestillata verdünnt zur Verwendung.

Das Versuchsergebnis bringt nachfolgende Tabelle 9.

Der Tabelle ist zu entnehmen: Die Meerschweinchen wiesen Agglutinationstiter von 1 : 5 bis 1 : 1000 auf. Während die Infektion mit unverdünnter Test des Stammes 126 nur bei 6 Meerschweinchen angezeigt wurde, gelang es mit verdünnter Test des gleichen Stammes 9 Meerschweinchen als infiziert zu erkennen. Mit unverdünnter und verdünnter Test des Stammes 146 waren jeweils nur 5 Meerschweinchen als infiziert zu ermitteln. Das besagt, dass Test aus Stamm 126 sowohl unverdünnt als auch verdünnt der Test aus Stamm 146 überlegen war und dass weiterhin Stamm 126 verdünnt bessere Ergebnisse lieferte als unverdünnt. Mit unverdünnter Test versagte nämlich die F.S.A. in 1 Fall beim Vorliegen eines Titers 1 : 75 und in 2 Fällen (einschliesslich eines fraglichen) bei einem Titer 1 : 100. Die unverdünnte und verdünnte Test des Stammes 146 bestätigte lediglich Titer 1 : 200 und höher und versagte vollkommen bei Titern 1 : 5 mit 1 : 100. Hinsichtlich der Stärke der Reaktionen gebührt bei beiden Stämmen der verdünnten Test der Vorzug.

Tabelle 9.

Eignung frisch isolierter Stämme

Ms. Nr.	S.L.A.	F.S.A. Stamm 126 unverdünnt	F.S.A. Stamm 126 verd. 1:1	F.S.A. Stamm 146 unverdünnt	F.S.A. Stamm 146 verd. 1:1
103	1:5	—	—	—	—
106	„	—	—	—	—
107	„	—	—	—	—
101	1:10	—	—	—	—
102	„	—	—	—	—
104	1:20	—	—	—	—
105	„	—	—	—	—
109	1:40	—	—	—	—
63	1:75	+++	+++	—	—
97	„	—	+++	—	—
94	1:100	—	+++	—	—
110	„	?	—	—	—
64	1:200	+++	+++	+++	+
93	„	+	+++	+	+
99	„	+++	+++	++	+++
69	1:400	++	+++	+++	+++
61	1:1000	+++	+++	+++	+++

Hinsichtlich der Zeit, in der die positiven Reaktionen auftraten, bestanden ebenso wie hinsichtlich einer allenfalls notwendigen Erwärmung keine Unterschiede.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass auch unter frisch isolierten Abortusbangstämmen, die als Testflüssigkeiten Verwendung fanden, Eignungsunterschiede bestehen. Der Versuch hat sich allerdings nur auf 2 solche Stämme erstreckt.

Die Versuche an nicht infizierten Meerschweinchen verliefen negativ.

Versuch 10.

In der Folge wurde die Test aus dem „frisch gezüchteten“ Stamm 126 des vorhergehenden Versuchs und die Test aus dem „älteren“ Stamm 112 miteinander verglichen. Es galt zu ermitteln, ob frisch isolierte oder ältere Laboratoriumsstämme zur Verwendung als Testflüssigkeiten zu bevorzugen sind.

Versuchsanordnung: Es wurden 17 infizierte und 2 nicht infizierte Meerschweinchen zum Versuch beigezogen. Die Testherstellung war die bisher übliche. Zur Bestimmung des Agglutinationstiters des Blutes der einzelnen Versuchstiere diente die S. L. A.

Die Versuchsergebnisse sind in nachfolgender Tabelle 10 einander gegenüber gestellt.

Tabelle 10.

Vergleich zwischen einem älteren und einem frisch gezüchteten Teststamm

Ms. Nr.	S. L. A.	F. S. A.	
		Stamm 112	Stamm 126
103	1:5	—	—
106	„	—	—
107	„	—	—
101	1:10	—	—
102	„	—	—
104	1:20	+	—
105	„	—	—
109	1:40	+	—
63	1:75	+++	+++
97	„	+	+
94	1:100	+++	+++
110	„	+	+
64	1:200	+++	+++
93	„	+	+
99	„	+	++
69	1:400	++++	++++
61	1:1000	++++	++++

Aus der Tabelle ist ersichtlich: Die Meerschweinchen hatten Agglutinationstiter von 1:5 bis 1:1000. Agglutinationstiter von 1:5 (in 3 Fällen) und 1:10 (in 2 Fällen) wurden von keiner der beiden Teste erfasst; desgleichen einmal der Titer 1:20. Zur Beurteilung der F. S. A. verblieben die Ergebnisse an 11 Meerschweinchen. Während die Banginfektion mit Test aus Stamm 112 in allen 11 Fällen angezeigt wurde, gelang dies mit Test aus Stamm 126 nur 9mal. Dabei wurde von Test aus 112 noch ein Titer von 1:20 und ein solcher von 1:40 angezeigt, während Test aus 126 bei Titern von 1:40 und darunter vollkommen versagte. Titer von 1:75 bis 1:1000 wurden von beiden Testflüssigkeiten lückenlos ermittelt. Test aus Stamm 112 erwies sich demnach zur Ermittlung

niederer Titer der Test aus Stamm 126 überlegen. Hinsichtlich der Stärke der Reaktion war Stamm 112 dem Stamm 126 ebenfalls überlegen, allerdings nur unbedeutend.

Auch die Zeit, in der positive Reaktionen auftraten, war bei Verwendung von Test aus 112 kürzer. Bei Benützung von Test 112 traten sie zwischen 5 und 40 Sekunden auf, bei Benützung von Test 126 zwischen 5 Sekunden und 1 Minute auf. Eine Erwärmung bei positiven Reaktionen war nie notwendig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der ältere Laboratoriumsstamm 112 dem frisch isolierten Stamm 126 überlegen war.

Die nicht infizierten Meerschweinchen reagierten stets negativ.

Weitere Versuche und Beobachtungen.

Das Arbeiten mit lebenden Abortus-Bangkulturen ist wegen der Empfänglichkeit des Menschen für den Erreger mit gewissen Gefahren verbunden. Deshalb wurde versucht, ob die F. S. A. nicht auch mit Test aus abgetöteten Abortuskulturen anzustellen ist. Die Abtötung erfolgte gemäss den Angaben von David (8) durch Erhitzen der Test auf Siedetemperatur. Zum Vergleich wurde neben einer Test aus abgetöteten Erregern auch die zu den früheren Versuchen verwendete, aus lebenden Bazillen hergestellte Test beigezogen. Technik, Beobachtung und Beurteilung war dabei die bisher geübte. Ein erster Versuch deutete auf eine Brauchbarkeit und, was die Erfassung niederer Titer anbetraf, sogar Überlegenheit der abgetöteten Testflüssigkeit gegenüber einer Test aus lebenden Erregern hin. Weitere, umfangreichere Versuche dagegen verliefen wenig günstig und ergaben schliesslich die völlige Untauglichkeit der abgetöteten Test. Alle diese Versuche wurden mit derselben abgetöteten Test angestellt und lagen zeitlich nahe bei einander. In den späteren Versuchen traten nämlich bei Zusammenbringung von Blut und Test mit oder ohne Verwendung von Oxalatlösung in allen Fällen Agglutinationen auf, gleichviel ob das Blut von infizierten oder nicht infizierten Tieren stammte. Ersatz der Oxalatlösung durch physiologische Kochsalzlösung oder Benützung der

Kalium- bzw. Natrium- oder Ammoniumoxalatlösung allein änderte an diesen Ergebnissen nichts. Durchschnittlich 10 bis 50 Sekunden nach Ansetzen der Proben trat überall eine langsam stärker werdende Ausflockung ein, welche sich durch nichts von den positiven Reaktionen an infizierten Versuchstieren unterschied. Dabei zeigte die Test bei genauer Prüfung mit der Lupe vor dem Zusatz des Blutes nicht die geringste Flockung. Auch der Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung oder Oxalatlösung allein ohne Blut zur Test löste schon Flockung aus. Vergleichsversuche mit Test aus lebenden Erregern verliefen normal.

Diese Misserfolge mit abgetöteter Test bei Verwendung der Diernhofer'schen Technik gaben Anlass, die Versuche mit der von David angegebenen Versuchsanordnung zu prüfen. David verwendete zu seinen Versuchen eine während 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzte Test, welche ohne Zusatz einer Oxalatlösung dem Frischblut zugegeben wurde. Auch diese Versuche missglückten, indem sich sowohl mit positivem als auch mit negativem Frischblut stets positive Reaktionen ergaben, so dass eine Brauchbarkeit der erhitzten Test nicht gegeben schien.

Diese Versuche mit Test aus abgetöteten Erregern nach der Methode Diernhofer oder David wurden an über 100 infizierten und nicht infizierten Meerschweinchen durchgeführt. Ausserdem wurden zur Herstellung dieser erhitzten Testflüssigkeiten im Versuch David verschiedene Bakterienstämme verwendet, so dass nicht angenommen werden kann, dass die aufgetretenen, unspezifischen Flockungen in Stammeseigenarten liegen.

Mit diesen Versuchen will kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden, weshalb von ihrer ausführlichen Wiedergabe Abstand genommen wurde.

Ferner behauptet David, dass ungekochte Test schon nach verhältnismässig kurzer Zeit zu diagnostischen Irrtümern Anlass geben kann. Meine Beobachtungen stimmen damit nicht überein; denn Test aus ungekochten Bakterien ist bei Aufbewahrung in Eisschranktemperatur (6 bis 8°C) monatelang haltbar.

C. Zusammenfassung.

Die F. S. A. wurde 640 mal an infizierten und 93 mal an nicht infizierten Meerschweinchen vorgenommen. Von den 640 Reaktionen an infizierten Meerschweinchen waren 454 positiv, 175 negativ und 11 fraglich. Die F. S. A. ergab demnach an infizierten Tieren in 71% der untersuchten Fälle ein positives Ergebnis und versagte in 29%, wobei in 2% ein fragliches und in 27% ein eindeutig negatives Ergebnis erzielt wurde. Die 93 an nicht infizierten Meerschweinchen gewonnenen Reaktionen waren sämtliche negativ.

Wie sich die positiven, fraglichen und negativen Reaktionen auf die durch die Serumlangsamagglutination ermittelten Titer 1:5 bis 1:4000 im allgemeinen — d. i. ohne Berücksichtigung der in den einzelnen Versuchen jeweils geänderten Technik — verteilen, zeigt nachfolgende Tabelle 11.

Tabelle 11.

Verteilung der positiven, fraglichen und negativen Reaktionen

Aggl. Tit.	positiv	fraglich	negativ	fraglich und negativ in %
1:5	0	0	42	100
1:10	4	0	36	90
1:20	7	0	21	75
1:30	0	1	23	100
1:40	5	0	7	58
1:50	3	0	7	70
1:75	19	0	16	45
1:100	72	7	18	25
1:200	115	3	5	6
1:400	92	0	0	0
1:600	48	0	0	0
1:800	37	0	0	0
1:1000	42	0	0	0
1:2000	6	0	0	0
1:4000	4	0	0	0
Summe	454 = 71%	11 = 2%	175 = 27%	

Aus der Tabelle ist ersichtlich: Bluttiter infizierter Meerschweinchen von 1:400 bis 1:4000 wurden durch die F. S. A. lückenlos erfasst. Fehlergebnisse an infizierten Meerschweinchen traten nur beim Vorliegen von Titern unter 1:400 auf und betrugen 100 – 6%

der Fälle, je nachdem es sich um Titer von 1:5 bis 1:200 handelte. Die 93 Reaktionen an nicht infizierten Meerschweinchen hatten in allen Fällen ein negatives Ergebnis.

Die Zeit, innerhalb der die positiven Reaktionen auftraten, betrug in 96% der Fälle eine Minute und weniger, in 1% 1—2 Minuten und in 3% 2—3 Minuten.

Eine Erwärmung war bei positiven Reaktionen nur in 4% der Fälle notwendig; 96% der positiven Ergebnisse wurden ohne Erwärmung erhalten.

Im einzelnen kann meinen Versuchen für die Durchführung der Frischblutschnellagglutination folgendes entnommen werden:

1. Kalium-, Natrium- und Ammoniumoxalat sind in 0,4%iger Lösung zur Verhinderung der Blutgerinnung gleich brauchbar; ebenso eine Mischung dieser Lösungen in gleicher Konzentration. Sie sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei +6—8° C wenigstens mehrere Monate lang haltbar.

2. Gefärbte Test ist ungefärbter Test vorzuziehen. Zur Färbung eignet sich eine 1%ige alkoholische Kristallviolettlösung, von welcher 1 Tropfen auf 1 ccm Bazillenaufschwemmung zugesetzt wird.

3. Sowohl zwischen gleich alten als auch zwischen älteren und frisch aus Organen isolierten Stämmen des Bang'schen Bazillus bestehen nicht unwesentliche Unterschiede in der Agglutinabilität. Zur Herstellung einer geeigneten Test ist deshalb ein stark agglutinabler Stamm zu verwenden.

4. Eine Mischtest aus verschiedenen Bangstämmen ist nicht empfehlenswert.

5. Eine Verdünnung der von Diernhofer angegebenen Originaltest mit gleichen Teilen doppelt destillierten Wassers war vorteilhaft, weil dadurch deutlichere (stärkere) Agglutinationen erzielt werden konnten.

6. Fehlergebnisse der Art, dass Blut nicht infizierter Tiere positive Ergebnisse brachte, sind nicht aufgetreten.

7. Trotzdem kommt die Frischblutschnellagglutination der Serumlangsamagglutination im allgemeinen an Zuverlässigkeit nicht gleich.

Dies wirkt sich besonders da aus, wo es sich um die Erfassung von Titern von 1 : 200 und darunter handelt.

8. Bei Titern von 1 : 400 und darüber decken sich die Ergebnisse beider Methoden vollständig.

Da bei diagnostischen Impfungen an Meerschweinchen Titer von 1 : 200 und darüber erst verhältnismässig spät (etwa 4 Wochen p. inf.) erreicht werden, ist die Frischblutschnellagglutination zur Frühdiagnose der Banginfektion beim Meerschweinchen nicht ohne weiteres geeignet.

An und für sich könnte die Methode unter Berücksichtigung der durch vorliegende Versuche ermittelten Erfahrungen als rasch arbeitend und billig bezeichnet werden. Auch gestattet sie, Meerschweinchen beliebig oft zu untersuchen, weil die Entnahme eines Tropfen Blutes leicht auszuführen ist und das Tier in keiner Weise geschädigt wird. Diese Vorteile lassen es aber nicht als gerechtfertigt erscheinen, die oben genannten Nachteile mit in Kauf zu nehmen.

D. Schrifttum.

1. Awerbuch, Celny, Fedoroff, Ginsburg, Reginskaja, cit. n. Schurnakowa, D.T.W. 1933, S. 214.
2. Bass und Watkins, cit. nach Wagener, T.R. 1930, S. 477.
3. Bevan, cit. nach Kolle, Kraus, Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. VI 2, S. 709.
4. Bevan, Jahresber. über die Veterinärmedizin, Jahrgang 48, 1929, S. 1042.
5. Bianchini, Archiv für Geflügelkunde 1931.
6. Buneya, Hall und Dorset, cit. nach Miessner und Berge, D.T.W. 1931, S. 401.
7. Damon, Ref. Jahresber. über die Veterinärmedizin, Jahrg. 49, 1929, S. 1032.
8. David, W.T.M. 1934, S. 193.
9. Diernhofer, W.T.M. 1933, S. 753.
10. Donham und Fitsch, Ref. T.R. 1932, S. 668.
11. Eickmann und Söntgen, D.T.W. 1924, S. 386.
12. Ali Ekrem, Inaug.-Diss. Hannover 1932.
13. Fleischhauer, D.T.W. 1931, S. 584.
14. Graham, Robert und Frank Thorp jun., Jahresber. über die Veterinärmedizin 1931, II, S. 1129.
15. Graham, Robert und Frank Thorp jun., Jahresber. über die Veterinärmedizin 1931, II, S. 1129.
16. Gwatkin, Jahresber. über die Veterinärmedizin 1932, 2, S. 1121.
17. Huddleson, J. Forest und Carlson, Jahresber. über die Veterinärmedizin 1927, 2, S. 1118.
18. Huddleson, J. Forest und Elizabeth Abell, Jahresb. über die Veterinärmedizin Jahrg. 49, 1929, S. 1041.
19. Kutzner, Inaug.-Diss. München 1932.
20. Lienhardt und Kitselman, Jahresb. über die Veterinärmedizin, Jahrg. 48, 1929, S. 1043.
21. Miessner und Berge, D.T.W. 1930, S. 401.
22. Miessner und Schütt, D.T.W. 1931, S. 3.
23. Miessner und Schütt, D.T.W. 1932, S. 497.
24. Noble, Zentrbl. f. Bakt. I. Abt. 1928, Bd. 90, S. 156.
25. Noble, cit. nach Schurnakowa, D.T.W. 1933, S. 214.
26. Palmer und Baker, cit. D.T.W. 1933, S. 388.

27. Peters, T.R. 1931, S. 126.
28. Runnels, Coon, Farley und Thorp, cit. n. Miessner und Berge, D.TW. 1930, S. 401.
29. Schmid, Ref. D.T.W. 1932, S. 772.
30. Schmid, T.R. 1933, S. 326.
31. Schurnakowa, D.T.W. 1933, S. 214.
32. Steenblock, T.R. 1930, S. 881.
33. Troisky und Mayofis, Zentrbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1933, Bd. 110, S. 450.
34. Wagener, T.R. 1930, S. 477.
35. Wagener, T.R. 1931, S. 177.
36. Zeynelabedin, D.T.W. 1933, S. 388.

Lebenslauf.

Ich, Ludwig Sandner, wurde am 19. April 1909 als Sohn des Distriktstierarztes Josef Sandner und seiner Ehefrau Therese in Osterhofen Nby. geboren.

Von 1915 bis 1920 besuchte ich die Volksschule in Osterhofen und die Knabenerziehungsanstalt in Fürstenstein, seit 1920 das humanistische Gymnasium in Passau. Hier schloss ich am 20. März 1929 das Mittelschulstudium ab.

Seit Sommersemester 1929 widmete ich mich ohne Unterbrechung dem Studium der Tierheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich dann im Januar 1934 beendete.

Vom 1. Februar 1934 an war ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit und mit der Erledigung des tierärztlichen Vorbereitungsdienstes an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleissheim beschäftigt.